

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-289017

(43)Date of publication of application : 18.10.1994

(51)Int.Cl.

G01N 33/50  
C12Q 1/68  
G01B 7/34  
G01N 33/483

(21)Application number : 05-079719

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO  
LTD

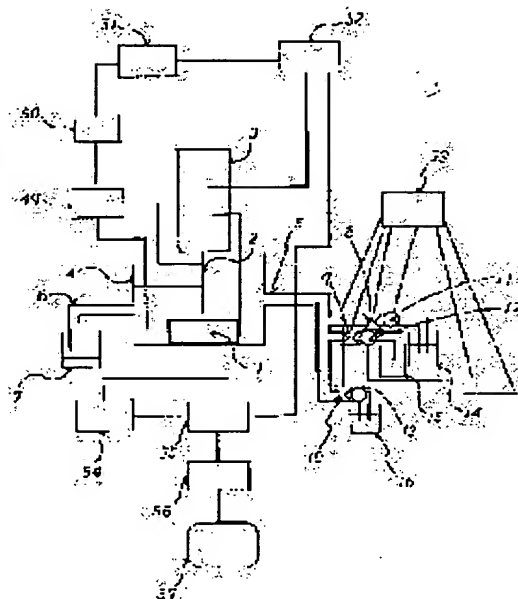
(22)Date of filing : 06.04.1993

(72)Inventor : NAKAGAWA TORU

**(54) METHOD AND MEASURING INSTRUMENT FOR DETERMINING DNA BASE  
ARRANGEMENT****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a method and a measuring instrument for determining DNA base arrangement utilizing a scanning-type probe microscope.

**CONSTITUTION:** The title measuring instrument consists of a scanning-type probe microscope, a probe 2 of the scanning-type probe microscope, a liquid solution cell 4 for housing one-chain DNA to be measured, an approach port 5 and a delivery port 6 of a liquid solution provided at the liquid solution cell 4, and liquid solution tanks 14, 15, and 16 connected to the approach port 5. By comparing a DNA image when a liquid solution without including base or DNA fragment with that when the liquid solution including the base or the DNA fragment, the base arrangement of the DNA can be simply and rapidly read using a small amount of sample. The scanning-type probe microscope should be a scanning-type tunnel microscope or a reactor force microscope.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 29.03.2000

[Date of sending the examiner's decision of  
rejection][Kind of final disposal of application other than  
the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3368934

[Date of registration] 15.11.2002

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 6 - 2 8 9 0 1 7

(43) 公開日 平成6年 (1994) 10月18日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/50		P 7055- 2 J		
C 1 2 Q 1/68		Z 7823- 4 B		
G 0 1 B 7/34		A 9106- 2 F		
G 0 1 N 33/483		C 7055- 2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 8

O L

(全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平5-79719

(22) 出願日 平成5年 (1993) 4月6日

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 中川 徹

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

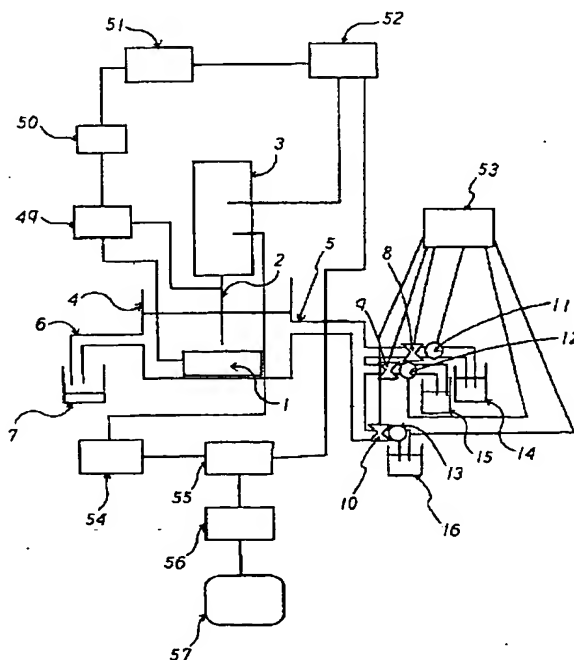
(74) 代理人 弁理士 池内 寛幸 (外1名)

(54) 【発明の名称】 DNAの塩基配列決定方法及びDNAの塩基配列決定用測定装置

(57) 【要約】

【目的】 走査型プローブ顕微鏡を利用したDNAの塩基配列決定方法及びDNAの塩基配列決定用測定装置を提供する。

【構成】 DNAの塩基配列決定用測定装置は、走査型プローブ顕微鏡と、前記走査型プローブ顕微鏡の探針2と被測定一本鎖DNAを収容するための溶液セル4と、溶液セル4に設けられた溶液の進入口5及び排出口6と、進入口5につながれている溶液タンク14、15、16から構成される。塩基またはDNA断片を含まない溶液を導入したときのDNA像と、前記塩基またはDNA断片を含む溶液を導入したときのDNA像とを比較することにより、DNAの塩基配列を簡単に、迅速に、しかも少量の試料を用いて読みとることができる。走査型プローブ顕微鏡は、走査型トンネル顕微鏡または原子間力顕微鏡であることが好ましい。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 走査型プローブ顕微鏡を用いたDNAの塩基配列決定方法において、少なくとも2種類の溶液中で一本鎖DNAを順次観察することを特徴とするDNAの塩基配列決定方法。

【請求項2】 少なくとも2種類の溶液が、一本鎖DNA断片を含まない1種類の溶液と、少なくとも1分子の一本鎖DNA断片を含む少なくとも1種類の溶液とからなる請求項1に記載のDNAの塩基配列決定方法。

【請求項3】 少なくとも2種類の溶液が、DNAを構成する塩基と塩基対をなす塩基を含まない1種類の溶液と、前記DNAを構成する塩基と塩基対をなす塩基を含む少なくとも1種類の溶液とからなる請求項1に記載のDNAの塩基配列決定方法。

【請求項4】 走査型プローブ顕微鏡が走査型トンネル顕微鏡である請求項1、2又は3に記載のDNAの塩基配列決定方法。

【請求項5】 走査型プローブ顕微鏡が原子間力顕微鏡である請求項1、2又は3に記載のDNAの塩基配列決定方法。

【請求項6】 走査型プローブ顕微鏡と、前記走査型プローブ顕微鏡の探針と被測定一本鎖DNAとを収容するための溶液セルと、前記溶液セルに設けられた溶液の進入口及び排出口と、前記進入口につながれている少なくとも2つの溶液タンクからなるDNAの塩基配列決定用測定装置。

【請求項7】 走査型プローブ顕微鏡が走査型トンネル顕微鏡である請求項6に記載のDNAの塩基配列決定用測定装置。

【請求項8】 走査型プローブ顕微鏡が原子間力顕微鏡である請求項6に記載のDNAの塩基配列決定用測定装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、分子生物学、医学、法医学、農林水産業、製薬業における、DNAの塩基配列決定方法及びDNAの塩基配列決定用測定装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】化学反応と分離分析を組み合わせたDNAの塩基配列決定方法（細胞の分子生物学第2版（1989）、中村桂子監修、教育社、185～188ページ）に代わる新規な方法として、走査型トンネル電子顕微鏡（以下、STMという）（ネイチャー339（1989）、484～486ページ：Nature 339（1989）、pp 484～486）や原子間力顕微鏡（以下、AFMという）（バイオフィジカル・ジャーナル58（1990年）、1251～1258ページ：Biophys. J. 58（1990）、pp 1251～1258）を用いたDNAの塩基配列決定法が研究され

ている。

【0003】STM及びAFMとは走査型プローブ顕微鏡の一種で、これは細い探針を物質表面に接近もしくは接触させて、原子レベルの精度でこの物質表面を走査し、探針と物質表面間に発生する様々な相互作用の結果生じるトンネル電流や力や熱などの物理量を検出することによって、物質表面の形状を調べる装置である。

【0004】STMやAFMを用いることにより、原理的には1分子のDNAから塩基配列を決めることが可能となる。また、従来法に比べて安全かつ簡便に塩基配列を決定できるので、将来的には、従来法に取って代わるものとして期待されている。

【0005】STMは、先端の尖った探針をピエゾ素子を用いて試料に原子数個分の距離まで近づけ、特定領域を走査しながら試料と探針との間に流れるトンネル電流を測定することにより試料の表面形状を調べる測定装置である。STMを用いることにより、試料の形状を原子レベルの分解能で調べることができる（フィジカル・レビュー・レターズ50（1983）、120～123ページ：Phys. Rev. Letters 50（1983）、pp 120～123）。

【0006】また、AFMはトンネル電流の代わりに探針と試料との間に働く原子間力を測定することにより、試料表面の形状を調べることができる（フィジカル・レビュー・レターズ56（1986）、930～933ページ：Phys. Rev. Letters 56（1986）、pp 930～933）。

【0007】以下にSTMやAFMを用いてDNAの塩基配列を決定する方法を示す。DNAは4種類の塩基、アデニン（A）、グアニン（G）、チミン（T）、シトシン（C）を含む。それらの塩基はそれぞれ分子の形状が違っているので、あらかじめ1種類の塩基だけから成る一本鎖DNAを観察し、各塩基の形状を調べておく。

【0008】次に、塩基配列を調べたい一本鎖DNAを基板に固定して、このDNAの形状をSTM、もしくはAFMを用いて調べる。既に4種類の塩基の形状は分かっているので、一本鎖DNAの形状から各塩基の位置が分かり、このDNAの塩基配列が分かる。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】STMを用いることにより、試料表面の原子一個一個を識別して見ることが可能である。しかし、これは導電性のある試料に限ったことであり、導電性のない試料表面を原子分解能で見るとは難しい。DNAは不導体なので走査型プローブ顕微鏡の分解能は高くなく、DNAの内部構造を調べることが難しい。そのため、DNAを構成する4種類の塩基の位置を正確に再現性良く調べることはできていない。

【0010】AFMは導電性のない試料でも観測可能であるが、測定分解能はSTMほど高くなく、DNA内の塩基の位置を完全に調べることは難しい。また、基板へ

のDNAの固定のされ方により塩基の見え方が変わるので、あらかじめ観察した、一種類の塩基だけを含むDNAの像から得られたデータをそのまま用いることができない。従って、STMやAFMを用いてDNAを構成する塩基の配列を決定することは難しい。

【0011】本発明は、前記従来の課題を解決し、STMやAFMを用いてDNAの塩基配列を正確に再現性良く決定する方法及び塩基配列を決定するための測定装置を提供することを目的とする。

#### 【0012】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するため、本発明のDNAの塩基配列決定方法は、走査型プローブ顕微鏡を用いたDNAの塩基配列決定方法であって、少なくとも2種類の溶液中で一本鎖DNAを順次観察することを特徴とする。

【0013】前記構成においては、少なくとも2種類の溶液が、一本鎖DNA断片を含まない1種類の溶液と、少なくとも1分子の一本鎖DNA断片を含む少なくとも1種類の溶液とからなることが好ましい。

【0014】また、前記構成においては、少なくとも2種類の溶液が、DNAを構成する塩基と塩基対をなす塩基を含まない1種類の溶液と前記DNAを構成する塩基と塩基対をなす塩基を含む少なくとも1種類の溶液とからなることが好ましい。

【0015】また、前記構成においては、走査型プローブ顕微鏡が走査型トンネル顕微鏡であることが好ましい。また、前記構成においては、走査型プローブ顕微鏡が原子間力顕微鏡であることが好ましい。

【0016】次に、本発明のDNAの塩基配列決定用測定装置は、走査型プローブ顕微鏡と、前記走査型プローブ顕微鏡の探針と被測定一本鎖DNAとを収容するための溶液セルと、前記溶液セルに設けられた溶液の進入口及び排出口と、前記進入口につながれている少なくとも2つの溶液タンクとからなるという構成を備えたものである。

【0017】前記構成においては、走査型プローブ顕微鏡が走査型トンネル顕微鏡であることが好ましい。また、前記構成においては、走査型プローブ顕微鏡が原子間力顕微鏡であることが好ましい。

#### 【0018】

【作用】前記本発明の構成によれば、少なくとも2種類の溶液中で一本鎖DNAを順次観察することにより、塩基の配列を正確に決定することができる。すなわち、一本鎖DNAは、その基板上への固定のされ方によって形状は違って見えるが、本発明の測定においては、異なる溶液を試料一本鎖DNAにさらしたときの試料一本鎖DNA像の変化のみをとらえているため、DNA内の各塩基の配列を確実に決定することができる。

【0019】また、少なくとも2種類の溶液が、一本鎖DNA断片を含まない1種類の溶液と、少なくとも1分

子の一本鎖DNA断片を含む少なくとも1種類の溶液とからなるという本発明の好ましい構成によれば、試料の一本鎖DNAで特定のタンパク質の情報がコードされている部分を調べたい場合に都合がよい。

【0020】適当な条件下では、一本鎖DNAは相補的な塩基配列をもつ一本鎖DNAと結合する。例えば、試料一本鎖DNAが塩基配列CCCAGTを含む場合、このDNAを塩基配列GGGTCAのみをもつ一本鎖DNA断片を含む溶液にさらすと、前記一本鎖DNA断片は試料一本鎖DNAの塩基配列CCCAGTの部分にのみ結合する。すなわち、調べたいタンパク質をコードしている一本鎖DNAを試料DNAにさらせば、前記一本鎖DNAは試料DNAのタンパク質をコードしている部分にのみ結合する。従って、タンパク質をコードしている一本鎖DNAを含む溶液をさらす前後の試料DNAの形状変化を走査型プローブ顕微鏡で調べることにより、目的とする塩基配列が試料DNAのどこにあるのかが分かる。

【0021】また、少なくとも2種類の溶液が、DNAを構成する塩基と塩基対をなす塩基を含まない1種類の溶液と、前記DNAを構成する塩基と塩基対をなす塩基を含む少なくとも1種類の溶液とからなるという本発明の好ましい構成によれば、DNA内の各塩基の配列を正確に決定することができる。すなわち、基板表面に固定されたDNAを溶液にさらしDNAを観察する。この状態では、DNA内の各塩基を識別できるほど走査型プローブ顕微鏡の分解能は高くないが、DNAのおおよその形態は識別できる。一本鎖DNAを構成する塩基は適当な条件下では、それぞれ特定の塩基と水素結合する性質を持っている。すなわち、AはTと、GはCと水素結合する。

【0022】そこで次に、走査型プローブ顕微鏡で引き続きDNAを測定しながら、溶液をAを含む溶液に変える。このA分子の大きさは0.5nm以上なので、AがDNA中のTと結合した際の、DNAの形状変化を走査型プローブ顕微鏡で充分とらえることができる。従って、変化した部分にTの存在することが分かる。同様にG、C、Tを含む溶液をそれぞれ一本鎖DNAにさらすことにより、DNA中のC、G、Aの配列が分かる。

【0023】また、走査型プローブ顕微鏡が走査型トンネル顕微鏡であると、溶液中で一本鎖DNAを観察するのに都合がよい。また、走査型プローブ顕微鏡が原子間力顕微鏡であると、溶液中で一本鎖DNAを観察するのに都合がよい。

【0024】次に、本発明のDNAの塩基配列決定用測定装置は、走査型プローブ顕微鏡と、前記走査型プローブ顕微鏡の探針と被測定一本鎖DNAとを収容するための溶液セルと、前記溶液セルに設けられた溶液の進入口及び排出口と、前記進入口につながれている少なくとも2つの溶液タンクを備えることにより、一本鎖DNAの

10

20

30

40

50

特定の塩基が特定の塩基と結合する前後の像が観察できるので、DNAの塩基配列が決定できる。

【0025】また、走査型プローブ顕微鏡が走査型トンネル顕微鏡であると、溶液中で一本鎖DNAを観察するのに都合がよい。また、走査型プローブ顕微鏡が原子間力顕微鏡であると、溶液中で一本鎖DNAを観察するのに都合がよい。

【0026】

【実施例】以下、実施例を用いながら本発明を詳しく説明する。図1は本発明の一実施例のSTMを用いたDNAの塩基配列決定用測定装置の原理説明図である。

【0027】被測定物質である一本鎖DNAを基板1に固定する。基板1と、圧電体3に接続する探針2とを溶液セル4に入れる。圧電体3はZ軸方向制御用サーボ回路52およびX-Y軸方向走査用回路54によってコントロールされ、探針2を原子レベルの精度で走査する。すなわち、圧電体3は電気信号（電圧）により伸縮し、三次元方向つまり探針2を上下するZ軸方向、探針2を図の手前や奥方向に移動させるY軸方向、探針2を図の左右方向に移動させるX軸方向に動くように構成されている。基板1上の測定試料と探針2との間にトンネル電流を流すための電圧発生器49を作動する。圧電体3により、探針2を前記一本鎖DNAの表面に原子数個分の距離まで近づけると、探針2と試料間にトンネル電流が流れる。電流の大きさは電流検出器50で検出する。トンネル電流の変化量は電流検出器50で電気信号に変えられ電気信号増幅器51で増幅される。前記トンネル電流の大きさは探針2と試料の間の距離に指数関数的に比例するので、この距離の微小な変化をトンネル電流の変化量から知ることができる。

【0028】そこで、トンネル電流の値が一定になるようにZ軸方向制御用サーボ回路52を用いて探針2を走査し、X、Y、Z軸方向のメモリー装置55およびデータ解析装置56を通して探針2の動きをディスプレイ57に表示することにより、試料の形状が分かる。

【0029】溶液タンク14、15、16内の溶液はそれぞれポンプ11、12、13に汲み出され細管5を通過して溶液セル4に送られ、細管6を経て廃液タンク7に排出される。ポンプ11、12、13の運転とバルブ8、9、10の開閉は、バルブ・ポンプ制御装置53により制御する。例えば、溶液タンク14内の溶液を溶液セル4に送る場合は、バルブ8を開け、ポンプ11を運転する。他のバルブ9、10は全て閉じ、ポンプ12、13は運転しない。このようにして溶液タンク14内の溶液のみを溶液セル4に入れる仕組みとなっている。

【0030】図1においては、3つの溶液タンクとそれに付随するバルブ、ポンプしか描かれていないが、実際はタンク数はいくらかでも増やすことができる。図2は、本発明の一実施例のAFMを用いたDNAの塩基配列決定用測定装置の原理説明図である。図3は図2の試料の

測定部を拡大したものである。

【0031】まず図2について説明する。図2においては、図1で示されたいくつかの部分がそのまま利用されている。図1と共通する部分の説明は省略する。X-Y軸方向走査用回路154で走査する範囲やピッチを予め設定しておき、探針102を試料表面に接近または接触させて試料表面を走査する。

【0032】光源112から出たレーザー光などの光105はレンズ113で収束し、探針の根部103に当たる。この時に探針102と基板101との間に原子間力が働くと、探針の根部103がそれに応じてたわみ、このため、レーザー光105の反射角が変化する。この反射角の変化をセンサー150でキャッチし電気信号に変え、この信号は電気信号増幅器151で増幅される。この場合に、Z軸方向制御用サーボ回路152は、センサー150の電気信号の出力が常に一定になるような制御信号を圧電体111に出力するようになっている。すなわち強い原子間力が働いて探針102と基板101の距離が近づくような力が生じた場合にはその力が生じていなかったときの力と同じになるよう試料がZ軸方向で引き離されるように作動する。このようにして試料上を所定の範囲にわたって走査し、X、Y、Z軸方向のメモリー装置155、データ解析装置156、ディスプレイ157または記録装置（図示せず）により試料検査結果が出力される。

【0033】なお、この場合、センサー150はフォトダイオードである。次に図3について説明する。基板101を基板110に固定する。前記基板110はオーリング108、109によって溶液セル107の底部の穴を封入するための基板である。圧電体111は基板101および110を原子レベルの精度で走査する。前記圧電体111は電気信号（電圧）により伸縮し、三次元方向すなわち試料を上下するZ軸方向、試料を図の手前方向や奥方向に移動させるY軸方向、試料を図の左右方向に移動させるX軸方向に動くように構成されている。溶液セル107はレーザー光が透過できるようにガラスでできている。探針の根部103の上面には金属が蒸着されていて、レーザー光などの光を反射できる。探針の根部103に接続する探針の基部104は溶液セル107に固定されている。

【0034】探針102、探針の根部103、探針の基部104は半導体微細加工技術によって、シリコン、酸化シリコン、窒化シリコンのいずれかの材料から作製する。探針102の先端の曲率半径は、20nm以下が好ましい。

【0035】また、一本鎖DNAに4種類の塩基を特異的に結合させるためには、公知の生化学的手法（例えば、細胞の分子生物学、第2版（1989）、中村桂子監修、教育社、188～192ページを参照）を用いる。

【0036】まず、あらかじめ、一本鎖DNAにプライマー（被測定一本鎖DNAの特定領域に結合する相補的な塩基配列をもつヌクレオチドで、一般に、一本鎖の端に結合する）を結合させておく。このDNAを酵素ポリメラーゼと4種類の塩基（A、T、C、G）の溶解した溶液に入れると、ポリメラーゼの働きにより、A、T、C、Gが一本鎖DNA中のT、A、G、Cにそれぞれ結合して2本鎖DNAが形成される。

【0037】また、被測定一本鎖DNAに、相補的な塩基配列をもつ一本鎖DNAを結合させるには、前記相補的な塩基配列をもつDNAの溶解した溶液にさらし、60℃で約一時間反応させれば良い。

【0038】また、被測定一本鎖DNA内の塩基に相補的な塩基が結合するためには、一本鎖DNA内の塩基が基板に対して外側を向いている必要がある。一本鎖DNAは糖とリン酸残基が交互につながった長い鎖状分子で、糖にはA、C、G、Tが結合し、リン酸部分はpH=7付近で負の電荷を帯びている。従って、正の電荷を帯びている基板に一本鎖DNAを固定することにより、塩基を基板に対して外側に向けることができる。このために、被測定一本鎖DNAを固定する基板としては、へき開した雲母、正の電荷の帯びた薄膜（例えば、雲母基板上に積層されたラングミュアプロジェクト（LB）膜）等がある。また、へき開したグラファイトや金の蒸着膜上の一本鎖DNAを測定する場合も、塩基が基板の外側を向いているDNAを探し、それを測定することで、塩基配列を決定することができる。

【0039】この中でも、ワイゼンホルンら（ラングミュア第7巻、8ページ（1991年）：A. L. Weisenborn et al. *Langmuir*, 7 (1), p8 (1991)）が開発したDNA固定方法は優れている。へき開した雲母基板上にdioctadecyldimethylammoniumbromide（ジオクタデシルジメチルアンモニウムブロマイド；以下DODABと記す）とL- $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylglycerol（L- $\alpha$ -ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール；以下DPPGと記す）の混合単分子膜をラングミュアプロジェクト法により積層する。雲母に積層されたDODABとDPPGは、それぞれ正と負の電荷を帯びて

いる。DODABのみの単分子膜にDNAを固定すると、一本鎖DNAがまっすぐに伸びずに凝集する場合があるが、混合膜の場合はその様なことが少ない。

【0040】以下に、具体的な実施例を示す。

#### 実施例1

30塩基対分だけ切断し取り出した大腸菌DNAの塩基配列を本発明の塩基配列決定方法で読みとった。以下に詳細を示す。

【0041】まず、30塩基対からなる大腸菌DNAを20 $\mu$ g/l以下の濃度となるように塩濃度0.1 $\times$ S

SCの溶液に溶解する（1 $\times$ SSCは150mMの塩化ナトリウムと15mMのクエン酸ナトリウムの混合溶液）。そして、この溶液を煮沸した湯に10分間つけた後、氷水で急冷して、大腸菌DNAを一本鎖DNAにした。この溶液に10 $\times$ SSCを加え、10ml中に一本鎖DNAが200 $\mu$ g含む6 $\times$ SSCの溶液を作った。なお、今回用いたDNAの塩基配列を、マクサム・ギルバード法であらかじめ調べた。その結果、3'-GAA TCCATAGGTTAATGAGGCGAACCGG GG-5'の塩基配列を持つことが分かった。

【0042】次に、へき開したグラファイト基板、もしくは約10nmの厚さの金が蒸着されている雲母基板を前述の塩基配列をもつ一本鎖DNAを含む溶液に1時間浸した後、6 $\times$ SSCの溶液で洗浄し、図1に示した塩基配列決定用測定装置に組み込んだ。

【0043】次に、一本鎖DNAの断片（塩基配列は5'-AATTA-3'）を0.2 $\mu$ g/l含む2 $\times$ SSCの溶液、及び、洗浄用として、2 $\times$ SSCの溶液をそれぞれ溶液タンク14、15に入れた。また、溶液セル4が60℃になるようにヒーターの上に乘せて測定を行った。

【0044】試料の観察はトンネル電流一定モードで行い、探針2と試料間の電位差は100mV、トンネル電流は0.6nAとした。まず、溶液セル4に洗浄用の溶液を1 $\mu$ l/min.の流量で導入し、基板表面上の一本鎖DNAの観察を行ったところ、長い棒状の像が見えた。この像を観測しつつ、前述の5'-AATTA-3'の塩基配列をもつDNA断片を含む溶液を1 $\mu$ l/min.の流量で導入した。約20分後に、DNAの像に変化が現れた。すなわち、長い棒状の像の中心部分が太くなって見えた。詳しく調べてみたところ、3'末端から12番目の塩基から16番目の塩基までの部分が太くなって見えた。従って、被測定一本鎖DNAの3'末端から12番目から16番目までの塩基配列がTTAATであることが分かった。この結果は、マクサム・ギルバード法より求めた結果と一致した。

#### 【0045】実施例2

DNAの塩基配列決定用AFM装置（図2、3参照）を用いて、実施例1と同様に一本鎖DNAの塩基配列を調べた。

【0046】へき開したグラファイト、へき開した雲母、厚さ約10nmの金が蒸着された雲母基板に、実施例1と同様な方法で一本鎖DNAを基板1に固定した。測定においてはAFMの探針102にかかる力を数ナニュートン以下にして、測定中、探針102によって被測定物質のDNAが変形、もしくは基板101から剥離しないようにした。また、溶液セル107にヒーター線を巻き、セル内の溶液の温度が60℃に保たれるようにした。

【0047】この結果、実施例1と同様、一本鎖DNA

の特定領域の塩基配列を決定できた。

#### 実施例 3

実施例 2 と同様に、一本鎖 DNA を測定した。但し、ワイゼンホルンら（ラングミュア第 7 巻、8 ページ（1991 年）：A. L. Weisenhorn et al. Langmuir, 7 (1), p 8 (1991)）が開発した方法をそのまま用いて、DNA 固定用基板を作製した。すなわち、へき開した雲母に、アラキンの LB 膜を一層、その上に、DODAP と DPPG の混合膜（1 : 1）を一層積層した。この基板に、実施例 1 と同様の方法を用いて一本鎖 DNA を固定した。

【0048】この結果、実施例 2 と同様、一本鎖 DNA の特定領域の塩基配列を決定できた。

#### 実施例 4

プライマーの結合した被測定一本鎖 DNA を公知の方法により作製した。

【0049】まず、M13 系ファージに 3' - GAATCCATAGGTTAATGAGGCGAACCGGGG - 5' の塩基配列を持つ一本鎖 DNA を組み込み、これに M13 ファージのプライマーである 5' - GTAAACGACGGCCAGT - 3' を結合させ、被測定一本鎖 DNA を作った（詳しくは、例えば、高浪満、大井龍夫編、DNA シークエンス解析マニュアル、丸善出版、1983 年）。

【0050】この一本鎖 DNA を 20  $\mu\text{g}/\text{l}$  以下の濃度となるように塩濃度 0.1  $\times$  SSC の溶液に溶解した。次に、実施例 1 と同様の方法でこの一本鎖 DNA をグラファイト基板、もしくは厚さ約 10 nm の金の蒸着された雲母基板に固定し、塩基配列決定用 STM 装置（図 1 参照）に組み込んだ。また、溶液セル 4 をヒーターの上に乗せ、セル内の温度を 37℃ に保つようにした。

【0051】次に、DNA ポリメラーゼであるクレノウ酵素 1  $\mu\text{g}/\text{l}$ 、塩化ナトリウム 20 mmol/l、EDTA 0.1 mmol/l の溶解した pH = 7.5 のトリス塩酸緩衝溶液 7 mmol/l 溶液と、これに 5 mmol/l の A、T、G、C をそれぞれ加えた 4 種類の溶液の計 5 種類の溶液を作り、それぞれを溶液タンクに入れた。

【0052】試料の観察はトンネル電流一定モードで行い、探針 2 と試料間の電位差は 100 mV、トンネル電流は 0.6 nA とした。溶液セル 4 に、まず、塩基の入っていない溶液を 1  $\mu\text{l}/\text{min.}$  の流量で導入し、基板表面上の一本鎖 DNA の観察を行ったところ、長い棒状の像が見えた。この像を観測しつつ、A、T、G、C の各溶液を順番に溶液セル内に導入した。但し、一種類の溶液の導入時間は 10 分とし、各溶液を導入する前に、塩基の入っていない溶液を 5 分間溶液セルに導入し、セル内を洗浄した。

【0053】この結果、長い棒状に見えた一本鎖 DNA

の STM 像は、端から少しずつ太くなっていった。すなわち、T の溶けた溶液をセル内に導入したときに、少しでも DNA が太くなって見えた場合、その太くなった部分には T と相補的な塩基である A が存在していることが分かった。また、太くなる領域の大きさを調べることで A が何個存在しているかも調べることができた。このようにして、一本鎖 DNA の塩基配列が決定できた。

#### 【0054】実施例 5

DNA の塩基配列決定用 AFM 装置（図 2、3 参照）を用いて、実施例 4 と同様に一本鎖 DNA の塩基配列を調べた。

【0055】へき開したグラファイト、へき開した雲母、厚さ約 10 nm の金が蒸着された雲母基板に、実施例 1 と同様の方法で一本鎖 DNA を基板に固定した。測定においては AFM の探針 102 にかかる力を数ナニュートン以下にして、測定中、探針 102 によって被測定物質の DNA が変形、もしくは基板 101 から剥離しないようにした。また、溶液セル 107 にヒーター線を巻き、セル内の溶液の温度が 37℃ に保たれるようにした。

【0056】この結果、実施例 4 と同様、一本鎖 DNA の塩基配列を決定できた。

#### 実施例 6

実施例 5 と同様に、一本鎖 DNA を測定した。但し、ワイゼンホルンら（ラングミュア第 7 巻、8 ページ（1991 年）：A. L. Weisenhorn et al. Langmuir, 7 (1), p 8 (1991)）が開発した方法をそのまま用いて、DNA 固定用基板を作製した。すなわち、へき開した雲母に、アラキンの LB 膜を一層、その上に、DODAP と DPPG の混合膜（1 : 1）を一層積層した。この基板に、実施例 1 と同様の方法を用いて一本鎖 DNA を固定した。

【0057】この結果、実施例 5 と同様、一本鎖 DNA の特定領域の塩基配列を決定できた。

#### 【0058】

【発明の効果】以上説明した通り、本発明によれば、少なくとも 2 種類の溶液中で一本鎖 DNA を順次観察することにより、塩基の配列を正確に決定することができる。すなわち、一本鎖 DNA は、その基板上への固定のされ方によって形状は違って見えるが、本発明の測定においては、異なる溶液を試料一本鎖 DNA にさらしたときの試料一本鎖 DNA 像の変化のみをとらえているため、DNA 内の各塩基の配列を確実に決定することができる。

【0059】また、少なくとも 2 種類の溶液が、一本鎖 DNA 断片を含まない 1 種類の溶液と、少なくとも 1 分子の一本鎖 DNA 断片を含む少なくとも 1 種類の溶液とからなることにより、試料の一本鎖 DNA で特定のタンパク質の情報がコードされている部分を調べたい場合に都合がよい。すなわち、タンパク質をコードしている一

本鎖DNAを含む溶液をさらす前後の試料DNAの形状変化を走査型プローブ顕微鏡で調べることにより、目的とする塩基配列が試料DNAのどこにあるのかが分かる。

【0060】また、少なくとも2種類の溶液が、DNAを構成する塩基と塩基対をなす塩基を含まない1種類の溶液と、前記DNAを構成する塩基と塩基対をなす塩基を含む少なくとも1種類の溶液とからなることにより、DNA内の各塩基の配列を正確に決定することができる。

【0061】また、走査型プローブ顕微鏡が走査型トンネル顕微鏡であると、溶液中で一本鎖DNAを観察するのに都合がよい。また、走査型プローブ顕微鏡が原子間力顕微鏡であると、溶液中で一本鎖DNAを観察するのに都合がよい。

【0062】次に、本発明のDNAの塩基配列決定用測定装置によれば、走査型プローブ顕微鏡と、前記走査型プローブ顕微鏡の探針と被測定一本鎖DNAとを収容するための溶液セルと、前記溶液セルに設けられた溶液の進入口及び排出口と、前記進入口につながれている少なくとも2つの溶液タンクを備えることにより、一本鎖DNAの特定の塩基が特定の塩基と結合する前後の像が観察できるので、DNAの塩基配列が決定できる。

【0063】また、走査型プローブ顕微鏡が走査型トンネル顕微鏡であると、溶液中で一本鎖DNAを観察するのに都合がよい。また、走査型プローブ顕微鏡が原子間力顕微鏡であると、溶液中で一本鎖DNAを観察するのに都合がよい。

【0064】DNAの塩基配列を迅速に決めることは、分子生物学、医学、法医学、農林水産業、製菓業の分野でたいへん重要である。特に、遺伝病の治療や、DNA操作による植物等の品種改良、有用物質の生物による生産を行う場合、DNAの塩基配列を読みとることは基礎技術として今後ますます重要になってくると考えられる。

【0065】本発明によれば、今までの方法に比べて簡便で少量のDNAしか必要としないので、これらの分野に多大な恩恵を与えるものである。さらに、現在、ヒトのDNA配列をすべて決めてしまおうとする“ヒトゲノム解析計画”が進められている。この場合、読みとるべきヒトDNAの塩基対の数は28億と非常に多く、迅速にしかも正確に塩基配列を読みとる手段の開発が強く望まれている。本発明は、このゲノム解析の有力な手段となろう。

【0066】なお、本発明はDNAの塩基配列を決定する方法とその測定装置に関するものであるが、RNAの塩基配列も同様の原理で決定できることは言うまでもない。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例のDNAの塩基配列決定用S 50

TM装置の原理説明図。

【図2】本発明の一実施例のDNAの塩基配列決定用AFM装置の原理説明図。

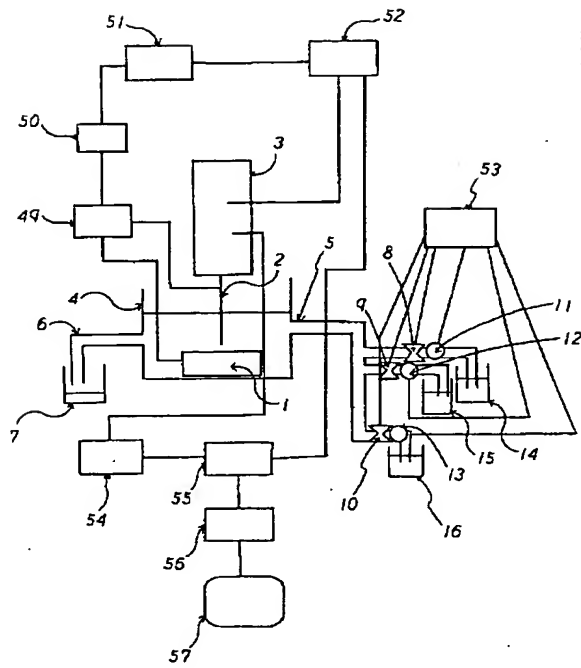
【図3】図2の探針部分の拡大図。

#### 【符号の説明】

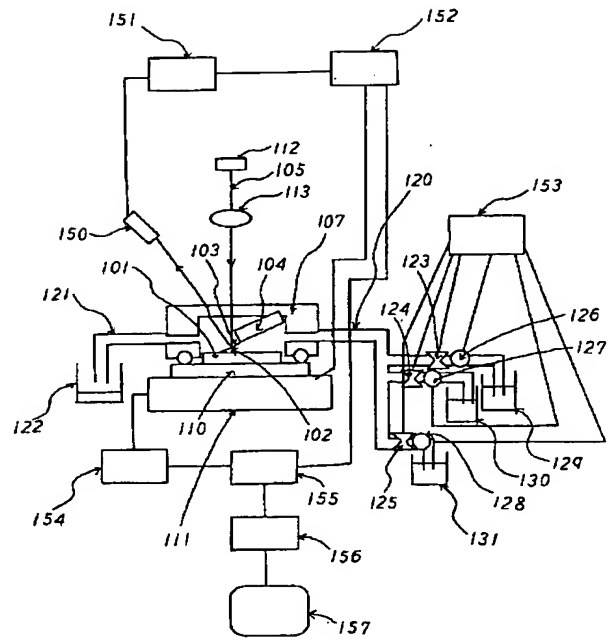
- |    |                     |
|----|---------------------|
| 1  | 基板                  |
| 2  | 探針                  |
| 3  | 圧電体                 |
| 4  | 溶液セル                |
| 10 | 5 細管                |
|    | 6 細管                |
|    | 7 廃液タンク             |
|    | 8、9、10 バルブ          |
|    | 11、12、13 ポンプ        |
|    | 14、15、16 溶液タンク      |
|    | 49 電圧発生器            |
|    | 50 トンネル電流検出器        |
|    | 51 電器信号増幅器          |
|    | 52 Z軸方向サーボ回路        |
| 20 | 53 バルブ・ポンプ制御装置      |
|    | 54 X-Y軸方向走査用回路      |
|    | 55 X、Y、Z軸方向のメモリー装置  |
|    | 56 データ解析装置          |
|    | 57 ディスプレイ           |
|    | 101 基板              |
|    | 102 探針              |
|    | 103 探針の柄部           |
|    | 104 探針の基部           |
|    | 105 レーザー光線          |
| 30 | 107 溶液セル            |
|    | 108、109 オーリング       |
|    | 110 基板101を固定する基板    |
|    | 111 圧電体             |
|    | 112 レーザー光源          |
|    | 113 レンズ             |
|    | 120 細管              |
|    | 121 細管              |
|    | 122 廃液タンク           |
|    | 123、124、125 バルブ     |
| 40 | 126、127、128 ポンプ     |
|    | 129、130、131 溶液タンク   |
|    | 150 センサー            |
|    | 151 電器信号増幅器         |
|    | 152 Z軸方向サーボ回路       |
|    | 153 バルブ・ポンプ制御装置     |
|    | 154 X-Y軸方向走査用回路     |
|    | 155 X、Y、Z軸方向のメモリー装置 |
|    | 156 データ解析装置         |
|    | 157 ディスプレイ          |



【図1】



【図2】



【図3】

